

09/787559

532 Oc'd PCT/PTO 19 MAR 2001

113.1010

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Re: Application of: Michael BECHTEL, et al.
Serial No.: To Be Assigned
Filed: Herewith
For: **REGULATORY PROTEIN FROM
HUMAN KERATINOCYTES**

LETTER RE: PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

March 19, 2001

Sir:

Applicant hereby claims priority from German Patent Application No. 198 42 863.4 filed September 19, 1998 through International Application Serial No. PCT/DE99/02865 filed September 6, 1999.

Respectfully submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By William C. Gehris

William C. Gehris
Reg. No. 38,156

Davidson, Davidson & Kappel, LLC
485 Seventh Avenue, 14th Floor
New York, New York 10018
(212) 736-1940

I hereby certify that this correspondence and/or documents referred to as attached therein and/or fee are being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under "Express Mail" Mailing Label No. EL 743183923 US under 37 CFR 1.10 on the date indicated above, in an envelope addressed to: "Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231" on March 19, 2001.

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

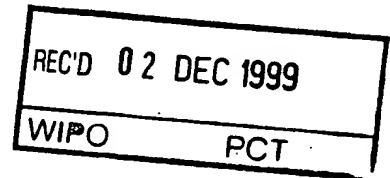
By: Samuel Gomez
Samuel Gomez

0 22 191 160
100 000 01 0110 100 011

This Page Blank (uspto)

100 000 01 0110 100 011

DE 99/2865



Bescheinigung

Herr Dr. Michael K r a m e r in Pfungstadt/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten"

am 19. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-
chen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
C 12 N 9/12 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. November 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 42 863.4



Wellenid, f

BEST AVAILABLE COPY

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinanten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle. Das erfindungsgemäße Protein weist die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz auf, und die erfindungsgemäße Nukleinsäure weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierenden Nukleotidsequenz auf.

Regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinanten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle.

Nach dem gegenwärtigen Stand der Technik werden in der Dermatotherapie zur Beeinflussung epidermaler Störungen wie z.B. der Autoimmundermatosen "Pemphigus vulgaris" und "Bullöses Pemphigoid" im wesentlichen Medikamente mit breitem Wirkungsspektrum eingesetzt, wie z.B. lokal bzw. systemisch applizierte Glukokortikoide, Vitamin-A-Säure-Derivate, Antimetabolite und Zytostatika, oder es wird mit mehr oder weniger unspezifischen Maßnahmen wie z.B. der sog. "Farbstofftherapie" oder der "Lichttherapie" behandelt. Die bekannten Wirkstoffe bzw. Maßnahmen haben jedoch allesamt den Nachteil, daß sie wenig spezifisch sind und damit naturgemäß zahlreiche Nebenwirkungen hervorrufen.

Die Bereitstellung spezifischerer Wirkstoffe scheiterte bislang an dem in der Dermatologie seit langem bestehenden grundsätzlichen Problem, daß die Zahl der zellulären Zielmoleküle (Zielstrukturen, Targets), die als Angriffspunkt für eine (spezifische) Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels — insbesondere unter medizinischen oder auch kosmetischen Gesichtspunkten — dienen könnten, in epidermalen Keratinozyten eng begrenzt ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, neue Zielstrukturen in epidermalen Keratinozyten bereitzustellen, die als Angriffspunkt für Diagnostika, Therapeutika, Kosmetika oder allgemein für die Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels dienen können.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Proteins der eingangs genannten Art, das bei aktivierten Keratinozyten aufreguliert, d.h. vermehrt exprimiert bzw. produziert und auf einem höheren Konzentrationsspiegel gehalten wird, und das die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz aufweist. Das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 wird im folgenden auch mit Protein pKe#122 bezeichnet.

Eine weitere Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer isolierten Nukleinsäure, die ein Protein kodiert, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist, und die entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierenden Nukleotidsequenz aufweist, wobei in diesem Sequenzprotokoll anstelle von "T" auch "U" stehen kann. Zu dieser erfindungsgemäßen Gruppe von Nukleinsäuren bzw. Nukleotidsequenzen gehören insbesondere auch Splice-Varianten und Sense- oder Anti-sense-Oligonukleotide, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleotidsequenz hybridisieren, vorzugsweise identisch mit bzw. komplementär zu dieser sind.

Die Erfindung umfaßt infolgedessen auch Proteine bzw. Polypeptide der eingangs genannten Art, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, welche aus einer solchen Splice-Variante resultiert, insbesondere aus der Splice-Variante einer mRNA, die mit der im

Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz identisch oder komplementär dazu ist.

Die erfindungsgemäßen Sense- oder Antisense-Oligonukleotide umfassen mindestens 6, vorzugsweise 8 bis 25 Nukleotide.

Der Begriff "hybridisiert" bezieht sich auf die im Stand der Technik bekannten Hybridisierungsverfahren unter üblichen, insbesondere unter hoch stringenten Hybridisierungsbedingungen. Die konkreten Hybridisierungsparameter wählt der Fachmann anhand der eingesetzten Nukleotidsequenz und seines allgemeinen Fachwissens (vgl.: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons Inc., Suppl. 37, Chapter 4.9.14).

Die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäure(n) kann (können) sowohl aus einer natürlichen Quelle als auch synthetisch oder halbsynthetisch gewonnen werden. In der Praxis hat sich besonders seine Ausführung als cDNA bewährt.

Das Polypeptid, das die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 aufweist und von der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure kodiert wird, und das im folgenden als Protein pKe#122 bezeichnet ist, wird in humanen epidermalen Keratinozyten aufreguliert, nämlich verstärkt exprimiert (produziert) und auf einem im Vergleich zum Ausgangszustand signifikant höheren Konzentrationsspiegel gehalten, wenn sich diese Zellen im "aktivierten" Zustand befinden, d.h. unter anderem im Zustand der Proliferation und/oder Migration, z.B. nach einer unfallbedingten Hautverletzung oder bei den autoimmunologisch ausgelösten bullösen Dermatosen "Pemphigus vulgaris" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Desmosomen) und "Bullöses Pemphigoid" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Hemidesmosomen). Der aktivierte Zustand der humanen epidermalen Keratinozyten äußert sich auch in einer im Vergleich zum Ruhezustand (Ausgangszustand) erhöhten Expression der bekannten Aktivierungsmarker uPA (Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und uPA-R (Rezeptor für Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und kann anhand dieser Marker qualitativ und quantitativ nach-

gewiesen werden. (Vgl.: Schäfer B.M., Reinartz J., Bechtel M.J., Inndorf S., Lang E., und Kramer M. D., 1996: *Dispase mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87), Exp. Cell Res. 228, S. 246-253*).

Das Protein pKe#122 weist ein Serin/Threonin-Kinase-Motiv, mehrere (vier) Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive und eine Kinase-Domäne mit ATP-Bindungsstelle auf. Es ist offensichtlich in Signalübertragungsvorgänge eingebunden, hat sehr wahrscheinlich eine Serin/Threonin-Kinase -Funktion und spielt eine mutmaßliche Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell- und/oder von Zell-Matrix-Verbindungen und/oder von Hemidesmosomen.

Im Stand der Technik ist es bekannt, daß Serin/Threonin-Kinasen in Keratinozyten die Funktion von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten beeinflussen. Von S. Blum und Koautoren wurde gezeigt, daß die Lokalisation bestimmter Zellkontakt-Moleküle der *Zonula adherens* durch Aktivierung bzw. Inaktivierung der Serin/Threonin Kinase des Typs "Proteinkinase C (PKC)" beeinflußt werden kann (vgl. Blum S., Ness W., Petrow W., Achenbach F., 1994: *Localization of protein kinase C in primary cultures of human keratinocytes in relation to cell contact proteins. Cell Sig. 6: 157-165*). Und M. Serres und Koautoren haben gezeigt, daß die Behandlung von Keratinozyten in Zellkultur (HaCaT-Zellen) mit den Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitoren Okadainsäure, Calyculin und PefablocTM einerseits zu einem Verlust der Zell-Zell-Verbindungen und andererseits zu einer verstärkten Serin/Threonin Phosphorylierung des in die Zelladhäsion involvierten Linkerproteins β -Catenin führt (vgl. Serres M., Grangeasse C., Haftek M., Durocher Y., Duclos B., Schmitt D., 1997: *Hyperphosphorylation of β -Catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell-contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. Exp. Cell. Res. 231: 163-172*). Diese in-vitro-Befunde wurden an epidermalen Kertinozyten explantierter humaner Haut bestätigt: nach Applikation von Okadainsäure (2 μ M, 24 Std.) trat eine deutliche Störung epidermaler Zell/Zell-Verbindungen mit Akantholyse auf. Weder PKC-Aktivatoren (wie z.B. Bryostatin-1 oder TPA = PMA= Phorbol Myristat Azetat) und PKC-Inhibitoren

(Sphingosin, Staurosporin, Chelerythrin, H7 = 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine) noch Inhibitoren oder Aktivatoren der Proteinkinase A (PKA), noch Tyrosinkinase- und Phosphatase-Inhibitoren oder weniger spezifische Phosphatase-Inhibitoren hatten einen derartigen Effekt auf die Zellen.

Auch bei der Ausbildung von Hemidesmosomen spielen Serin/Threonin-Kinasen eine wichtige Rolle (vgl. Mainiero F., Pepe A., Wary K.K., Spinardi L., Mohammadi M., Schlessinger J., Giancotti F.G., 1995: *Signal transduction by the alpha6beta4 integrin: distinct beta4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes*. EMBO J. 14:4470-4481).

Mit der isolierten Bereitstellung des Proteins pKe#122, nämlich mit der Beschreibung von Nukleotidsequenzen, die dieses Protein codieren, und mit der Angabe (einer) seiner Aminosäuresequenz(en) ist es möglich, den Stoffwechsel von physiologisch aktiven bzw. aktivierten Keratinozyten — und selbstverständlich auch von anderen das Protein pKe#122 exprimierenden Zellen — gezielt zu beeinflussen, insbesondere zu Zwecken der medizinischen und kosmetischen Therapie.

Die Erfindung betrifft desweiteren rekombinante DNS-Vektormoleküle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfassen, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweisen. Bei den DNS-Vektormolekülen handelt es sich vorzugsweise um das Plasmid pUEX-1 und/oder um das Plasmid pGEX-2T und/oder um das Plasmid pBK-CMV und/oder um das Plasmid pHR 2 (ein Abkömmling von Bluescript KS [Firma Stratagene, Heidelberg], enthält den humanen Keratin-14-Promotor), da sich diese Vektoren in der Praxis als sehr gut geeignet erwiesen haben. Als eukaryontische Zelle kommen insbesondere Zellen aus Zellkulturen, z.B. COS-Zellen, in Betracht, ebenso gut kann die betreffende Zelle aber auch Bestandteil eines lebenden Organismus, z.B. einer transgenen Maus, sein.

Die Erfindung umfaßt deshalb auch transformierte Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, die mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in diesen Zellen natürlicherweise oder als Folgen einer Rekombination enthalten ist, und die (infolgedessen) die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, besitzen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines erfindungsgemäßen Vektormoleküls zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.

Die erfindungsgemäßen Transfektanten eröffnen die Möglichkeit für Forschungs- und Entwicklungsarbeiten im Hinblick auf eine weitergehende Aufklärung der durch das Protein pKe#122-induzierten Veränderungen der Zellmorphologie und zellulären Basisfunktionen wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung, insbesondere im Hinblick auf die Beantwortung der Frage, ob das Proteins pKe#122 selbst eine "pathogene" Aktivität besitzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, wobei dieses Reagenz dadurch charakterisiert ist, daß es wenigstens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt. " Zum indirekten Nachweis" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß tatsächlich die das Protein kodierende mRNA direkt nachgewiesen wird — und somit das Protein nur indirekt (vermittels dieser mRNA).

Das Protein pKe#122 und die damit, d.h. mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz, verwandten Polypeptide, d.h. die Polypeptide, die durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Inversion von dieser Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 ableitbar sind, oder die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert,

welche mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 oder einer Teilsequenz davon identisch oder komplementär dazu ist oder zumindest hybridisiert, bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der dermatologischen Forschung und Entwicklung. Insbesondere können Antikörper gegen diese Polypeptide bzw. Proteine hergestellt werden, die dann mit entsprechender Modifikation entweder als Diagnostika oder als Therapeutika oder auch als Kosmetika ("cosmeceuticals") einsetzbar sind.

Die Erfindung umfaßt folglich auch die Verwendung eines solchen Proteins bzw. Polypeptids zur Herstellung eines (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpers gegen dieses Polypeptid, den besagten Antikörper selbst und ebenso seine Verwendung zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen, zur kosmetischen Behandlung der Epidermis und zur diagnostischen, therapeutischen und/oder kosmetischen Behandlung von anderen das Protein pKe#122 exprimierenden Geweben oder Organen.

Auch Sense- und/oder Antisense-Oligonukleotide kommen nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen als Wirkstoffe für eine Pharmakotherapie in Betracht (vgl. G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 24, C1115-C1119) — und überdies als Wirkstoffe mit einem in der Pharmakotherapie grundsätzlich neuen Wirkprinzip.

Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Sense- oder Antisense-Oligonukleotide zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung, insbesondere von dermatologischen Erkrankungen, oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis.

Eine technisch und wirtschaftlich bedeutende Einsatzmöglichkeit eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuren besteht nicht zuletzt auch darin, daß mit Hilfe eines solchen Moleküls in einem Screening-Verfahren aus einer sehr großen Anzahl bereitstehender Stoffe solche herausselektiert werden können, die

spezifisch an die betreffende Nukleinsäure oder das betreffende Polypeptid binden. Diese Stoffe können dann als Ausgangsmaterial (Leitstruktur) für die Entwicklung pharmakologisch einsetzbarer Substanzen dienen und bieten damit die Voraussetzungen für die Entwicklung alternativer Pharmazeutika zur Diagnose und Therapie, insbesondere der eingangs erwähnten dermatologischen Erkrankungen.

Im Hinblick darauf betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Identifizierung von pharmakologisch einsetzbaren Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen bzw. deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere inhibierend oder aktivierend wirken.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Herstellungs- und Anwendungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Herstellung des Proteins pKe#122

A) Gewinnung bzw. Herstellung eines Polynukleotids, das das Protein pKe#122 kodiert

Als Polynukleotid-Quelle dienen humane epidermale Keratinozyten einer Zellkultur bzw. eines Zellkulturmodells, das in der Publikation von Schäfer B.M., Reinartz J., Bechtel M.J., Inndorf S., Lang E., und Kramer M. D., 1996: *Dispase mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87)*, *Exp. Cell Res.* 228, S. 246-253, ausführlich beschrieben ist. Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen. Diese Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodell zeichnet sich dadurch aus, daß sie/es erlaubt, Keratinozyten durch enzymatische Zerstörung der Zell/Matrix-Kontakte, d.h. durch eine beispielsweise Dispase-induzierte Ablösung der Keratinozyten von der Kulturmatrix, vom ruhenden [uPA⁻/uPA-R⁻] in den aktivierten [uPA⁺/uPA-R⁺] Zustand zu überführen. Die Induktion des aktivierten Zustands ist reversibel: die (erneute) Ausbildung eines konfluenten (= maximal dicht gewachsenen), mehrschichtigen Zellverbands aus differenzierten Keratinozyten führt zur Abregulierung von uPA und uPA-R, d.h. zur Drosselung der Produktion und Einstellung auf einem niedrigeren Konzentrationsspiegel (siehe dazu die Publikation von Schäfer B.M., Stark H.J., Fusenig

N.E., Rodd R.F., Kramer M.D., 1996 *Differential expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPA-R), and inhibitor type-2 (PAI-2) during differentiation of keratinocytes in an organotypic coculture system*, Exp. Cell Res. 220:415-423).

Die Zellen dieser Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodells werden im folgenden auch als NHEK (= "normale humane epidermale Keratinozyten") bezeichnet.

Für die Bereitstellung der Zellkultur bzw. des Zellkulturmodells wurden folgende Maßnahmen durchgeführt: Mittels Hautbiopsie erhaltene humane epidermale Keratinozyten wurden über Nacht bei 4 °C trypsinisiert und anschließend nach der "feeder-layer"-Technik von J.G. Rheinwald und H. Green (1975, Cell 6, 331-334) in Petrischalen oder 175 cm² Kulturflaschen für die Dauer von 8 Tagen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Gehalt von 10% (Vol./Vol.) fetalem Kälberserum (FCS) und Zusätzen an Adeninhemisulfat, Insulin, Transferrin, Trijodthyronin, Hydrocortison, Forskolin, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin und Gentamycin) unter Differenzierungsbedingungen, nämlich erhöhten Kalziumspiegeln, kultiviert (37 °C, 7 % CO₂). Die Kultivierung erfolgte damit gemäß herkömmlicher und im Stand der Technik geläufigen Bedingungen. Unter diesen Bedingungen bilden Keratinozyten konfluente zwei- bis dreischichtige sog. "Epidermisäquivalente" oder Keratinozyten-"Sheets" aus.

Diese Epidermisäquivalente oder Keratinozytensheets wurden durch eine 30-minütige Behandlung mit Dispase II (2,4 mg/ml in DMEM ohne FCS) von der Kulturmatrix abgelöst, zweimal in DMEM gewaschen und anschließend für die Dauer von 4 bzw. 8 Stunden in komplettem, konditioniertem DMEM inkubiert. Die Inkubation in konditioniertem DMEM erfolgte, um den Einfluß von frischem FCS auszuschließen. Während der Inkubation fand in diesen flotierenden Keratinozytensheets eine Aufregulierung der Expression der bekannten Aktivierungsmarker uPA und uPA-R sowie des hierin erstmals beschriebenen Proteins pKe#122 statt. Die uPA/uPA-R-Aufregulierung war mittels bekannten Techniken wie Enzyme-Linked-

Immunosorbent- Assay (ELISA), In-situ Hybridisierung und Immunfluoreszenz nachweisbar. Aus den inkubierten Zellen wurde mittels der im Stand der Technik bekannten Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (vgl: Chromczynski P. and Sacchi N., 1986: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 162:156-159) die gesamte RNA gewonnen (Kit "RNA-Clean" der Firma AGS aus Heidelberg). Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA mittels Bindung an poly-T-beschichtete Kügelchen isoliert. Diese mRNA diente als Ausgangsmaterial für den nächstfolgenden Verfahrensabschnitt der Subtraktionsklonierung.

Für den Einsatz in Kontrollversuchen bzw. für Vergleichspräparate wurde mRNA von adhärenenten Keratinozytensheets isoliert, und zwar nach dem gleichen Verfahrensmuster wie vorstehend beschrieben, ausgenommen der Abweichung, daß für die Dauer der Dispasebehandlung zusätzlich zu der Dispase ein Dispasehemmer, z.B. Phosphoramidon (100µg/ml), appliziert wurde.

Nach dem Prinzip der Subtraktionsklonierung wurde eine Genbank erstellt, die vorzugsweise cDNA der dyshäsionsinduzierten Gene enthielt, d.h. solcher Gene, die nach Ablösung der Keratinozytensheets vermehrt in diesen (bzw. deren Zellen) exprimiert wurden. Zu diesem Zweck wurde die aus den Zellen der adhärenenten Keratinozytensheets gewonnene mRNA erneut an poly-T-beschichtete Kügelchen gebunden, auf diesen in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend gegen die mRNA von abgelösten, d.h. nicht-adhärenenten Keratinozytensheets hybridisiert. Diejenigen mRNA-Moleküle, die lediglich im nicht-adhärenenten Zustand, d.h. nach Dyshäsion exprimiert wurden und infolgedessen keinen Hybridisierungspartner fanden, verblieben im Überstand. Sie wurden in cDNA umgeschrieben und in den Klonierungsvektor pUEX-1 kloniert.

Die daraus resultierende Genbank wurde zwecks Überprüfung anschließend noch einem Southernblot-Verfahren mit [³²P]-markierter cDNA adhärenenter und nicht-adhärenenter Keratinozytensheets unterworfen. Diejenige cDNA oder vielmehr die sie enthaltenden

Wirtszellklone - hier der *E. coli* Stamm MC1061 -, die nach Dyshäsion eine deutliche Aufregulation zeigten, wurden anschließend über Nacht bei 30 °C unter üblichen Kulturbedingungen kultiviert bzw. vermehrt. Aus diesen *E. coli*-Klonen wurde die Plasmid-DNA (pUEX1-cDNA) herauspräpariert, und die aus dem pUEX1-Vektor herausgeschnittenen cDNA-Fragmente wurden mittels Random-priming [³²P]-markiert. Die markierte cDNA wurde als Sonde in Northernblots mit RNA aus adhären und nicht-adhären Keratinozytensheets eingesetzt. Die Klone, die cDNA enthielten, die bei Verwendung als Sonde im Northernblot-Verfahren kein oder nur ein geringes Signal mit der RNA adhärenter Keratinozyten, dagegen ein deutliches Signal mit RNA nicht-adhärenter Keratinozytensheets erkennen ließen, wurden für den nachfolgenden Verfahrensabschnitt der Sequenzierung ausgewählt.

Bei der Sequenzierung der betreffenden Klone mittels des "nicht-radioaktiven Cycle-Sequencing", das eine Modifikation der Sequenzierungsmethode nach Sanger darstellt, und mittlerweile eine dem Stand der Technik geläufige Methode ist, wurde unter anderem das Gen mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 gefunden. Dieses Gen und das zugehörige Protein erhielten die Bezeichnung pKe#122. Nähere Untersuchungen der zu dem Gen pKe#122 gehörigen d.h. pKe#122-spezifischen mRNA (aus abgelösten, d.h. nicht-adhären Keratinozytensheets) lieferten die Informationen, daß diese mRNA eine Größe von etwa 4,8 kb aufweist und nach Dispase-induzierter Ablösung eine Aufregulation zeigt. Fig. 1 zeigt das Ergebnis eines Northernblots, der mit mRNA aus Keratinozytensheets (a) direkt nach bzw. (b) vier Stunden nach Dispase-induzierter Ablösung und mit [³²P]-markierter pKe#122-cDNA durchgeführt wurde. Dieses Ergebnis beinhaltet die Aussage, daß direkt nach der Ablösung wenig pKe#122-mRNA vorhanden oder jedenfalls nachweisbar war, vier Stunden später dagegen gro_e Mengen vorlagen (eine breitere, farbintensivere Bande), und zwar in der Molekulargewichtszone von etwa 4,8 kb.

Die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1 enthält am 3'-Ende an Position 2373-2375 ein Stopcodon, das den mutmaßlichen Ort des Transkriptionsendes vorgibt, und dem

genau 28 Nukleinsäuren vor der poly-A-Site eine der sog. "Polyadenylation site" (AATAAA) sehr ähnliche Sequenz, nämlich AATAA, folgt.

Damit ergibt sich für die Gesamtstruktur des pKe#122 -Gens, bzw. verallgemeinert eines Polynukleotids, das für das Protein pKe#122 kodiert, daß dieses Gen bzw. Polynukleotid mit der im Sequenzprotokoll **SEQ IN NO:1** dargestellten Nukleotidsequenz oder einer Teilsequenz davon identisch oder hierzu komplementär ist, oder ganz oder teilweise mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:1** dargestellten Nukleotidsequenz oder mit einer Teilsequenz davon oder mit einer komplementären Sequenz zu einer dieser beiden hybridisiert, wobei in dem Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:1** anstelle von "T" auch ein "U" stehen kann, und daß von diesem Gen bzw. Polynukleotid eine mRNA abgelesen wird, die einer cDNA von ca. 4,8 kb entspricht bzw. homolog ist.

B) Ableitung der Aminosäurenabfolge und Charakterisierung des Proteins pKe#122 anhand des dafür kodierenden Polynukleotids (pKe#122 -Gens)

Anhand des genetischen Codes wurde mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens (Programm: *HUSAR* = *Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*, Version 4.0, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 1997) von der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:1** eine Aminosäuresequenz abgeleitet, die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:2** dargestellt ist. Die strukturelle Analyse dieser Aminosäuresequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:2** mit eben diesem Programm lieferte die folgenden Informationen:

- die Aminosäureabfolge von Position 40 bis 63 (LGKGNFAVVKLARHRVTK TQVAIK) entspricht bekannten Proteinkinase-Motiven mit ATP-Bindungsstelle,
- die Aminosäureabfolge von Position 152 bis 164 (IVHRDLKTENLLL) entspricht bekannten Serin/Threonin-Proteinkinase-Motiven,
- die Aminosäureabfolgen von Position 238 bis 240 (TLR), von Position 475 bis 477 (TGR), von Position 485 bis 487 (STR) und von Position 600 bis 603 (TTR) entsprechen bekannten Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C,

- die Aminosäureabfolge von Position 138 bis 156 (WQILSAVEYCHDHHIVHRD) stellt das pKe#122-1-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-1" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2),
- die Aminosäureabfolge von Position 481 bis 499 (LAEVSTRLSPLTAPCIVVS) stellt das pKe#122-2-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-2" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2),
- die Aminosäureabfolge von Position 339 - 352 (NHFAAIYYLLLERL) stellt das pKe#122-3-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-3" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2),
- die Aminosäureabfolge von Position 614 - 625 (GLARQVCQVPAS) stellt das pKe#122-4-Peptid dar, gegen das der anti-Peptid-Antikörper "Anti-pKe#122-4" im Kaninchen hergestellt wurde (vgl. Beispiel 2).

In Fig. 2 sind diese Strukturdaten des Proteins pKe#122 schematisch dargestellt. Fig. 2A zeigt das Proteinkinase-Motiv mit ATP-Bindungsstellen, das Serin/Threonin-Proteinkinase-Motiv und die vier Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C, und Fig. 2B zeigt die Sequenzabschnitte, gegen die anti-Peptid-Antikörper in Kaninchen hergestellt wurden.

Beispiel 2: Verwendung der Aminosäuresequenz des Proteins pKe#122 zur Herstellung polyklonaler Anti-Peptid-Antikörper

Mittels computergestützter Antigenizitätsanalyse unter Verwendung des in Beispiel 1 genannten Computerprogramms wurden Bereiche aus der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 ausgewählt, die zur Produktion polyklonaler Anti-Peptid-Antikörper geeignet erschienen. Diese Bereiche wurden nach dem bekannten "Multiple-Antigenic-Peptide"-Verfahren (vgl.: Posnett D.N., Tam J.P., 1989: *Multiple antigenic peptide method for producing antipeptide site-specific antibodies*. Methods-Enzymol. 1998; 178: 739-746) in Form separater Peptide (pKe#122-1 bis -4, vgl. Abb.2) mit einem Molekulargewicht von ca. 10-15 kD synthetisiert. Diese Peptide wurden ohne Zusatz einer Trägersubstanz zur adjuvanzunterstützten Immunisierung von Kaninchen

eingesetzt. Die Details dieses Peptid-Herstellungsverfahrens und dieses Immunisierungsverfahrens sind im Stand der Technik allgemein geläufig. Die Prä- und Postimmunseren wurden mit dem allgemein bekannten Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) auf die Reaktivität mit den jeweils zur Immunisierung verwendeten

Peptiden und Vergleichszeptiden getestet. Es war eine deutliche Immunisierung gegen die Peptide pKe#122-1, -122-2 und -122-4 nachweisbar. Zur Aufreinigung der polyklonalen Antikörper wurden die Postimmunseren zunächst einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen und dadurch die IgG-Fraktion angereichert. Mit dieser angereicherten IgG-Fraktion wurde anschließend eine Immunaффinitätschromatographie durchgeführt. Hierfür wurden jeweils die vier zur Immunisierung verwendeten Peptide pKe#122-1 bis -4 an Sepharose 4B immobilisiert und diese Peptid-Sepharose-4B-Konjugate in der Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Es resultierten drei weitgehend reine anti-Peptid-IgG-Fractionen, nämlich anti-Peptid pKe#122-1, anti-Peptid pKe#122-2 und anti-Peptid pKe#122-4. Diese drei affinitätsgereinigten Antikörperfraktionen zeigten eine eindeutige Immunreaktion mit dem jeweils korrespondierenden Antigen-Peptid. In Tabelle 1 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Mit dem Immunserum gegen das Peptid pKe#122-1, dem polyklonalen Antikörper anti-pKe#122-1, wurden außerdem Zellysate der Keratinozytenlinie HaCaT und der Keratinozytensheets 8 Stunden nach Ablösung mit Dispase (= nicht-adhärente Keratinozytensheets) im Westernblot-Verfahren auf die Expression des Proteins pKe#122 getestet. Sowohl in den HaCaT-Zellen als auch in den Zellen der abgelösten (nicht-adhären) Keratinozytensheets wurde eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca 70 kD nachgewiesen. Der zum Experiment zugehörige Westernblot ist in Beispiel 3B(2) ausführlich beschrieben und in Fig. 3 dargestellt. Er zeigt sowohl in HaCaT-Zellen als auch in den nicht-adhären) Keratinozytensheets ein Protein der Größe ca. 70 kD.

Der polyklonale Anti-Peptid-Antikörper pKe#122-1 wurde darüberhinaus mit dem hier in Beispiel 5 beschriebenen rekombinanten ca. 100 kD GST-pKe#122-Fusionsprotein (Fraktion 85 in Abb. 10 B) im Immunoblot-Verfahren ausgetestet. Der polyklonale Anti-

Peptid-Antikörper pKe#122-1 reagierte mit dem Fusionsprotein. Diese positive Reaktion wurde durch Vergleich mit Kontrollversuchen bestätigt, bei denen anstelle des Anti-Peptid-Antikörpers pKe#122-1 ein anti-GST-Antikörper, oder aber normales Kaninchen-IgG eingesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 4 dargestellt. Spur "a" in Fig. 4 zeigt den Kontrollansatz mit Ziege-Normal-IgG, Spur "b" in Fig. 4 zeigt den Ansatz mit Ziege-anti-GST-IgG, Spur "c" in Fig. 4 zeigt den Ansatz mit Kaninchen-Normal-IgG und Spur "d" in Fig. 4 zeigt den Ansatz mit Kaninchen-anti-pKe#122-1.

Beispiel 3: Verwendung des Proteins pKe#122 bzw. gegen das Protein oder gegen die mRNA des pKe#122-gerichtete Reagenzien zum Nachweis des aktivierten Zustands humaner epidermaler Keratinozyten

A) Verwendete Keratinozyten

Als Versuchszellen bzw. Targetzellen (=Zielobjektzellen) dienten HaCaT-Zellen und humane epidermale Keratinozyten der Zellkultur bzw. des Zellkulturmodells (NHEK), das in der Publikation B.M. Schäfer und Koautoren (a.a.O.) ausführlich beschrieben und hier im Beispiel 1 (A) kurz zusammengefaßt ist. Auf den Inhalt dieser Publikation wird auch an dieser Stelle ausdrücklich Bezug genommen. Desweiteren wurden Hautbiopsien auf die Expression des pKe#122-Proteins untersucht.

B) Nachweisverfahren, die auf der Anwendung der gegen das Protein pKe#122 gerichteten Antikörper beruhen

1. Immunhistologie

Mit Hilfe eines Kryotoms werden 5 µm-dicke Gefrierschnitte von Geweben aus Hautbiopsien von klinisch unauffälliger Normalhaut und klinisch auffälliger, läsionaler Haut infolge der Erkrankungen Pemphigus vulgaris, Bullöses Pemphigoid und Psoriasis vulgaris hergestellt. Diese werden bei Raumtemperatur getrocknet und in 100% Azeton fixiert (anstelle von Azeton kann ebensogut auch 100% Methanol, 100% Ethanol oder

4%-iges Paraformaldehyd verwendet werden). Danach werden die Schnitte gemäß im Stand der Technik bekannter sog. "Blockierungsverfahren" behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Im vorliegenden Beispielfall wurden zwei Blockierungsschritte durchgeführt: (1.) eine Blockierung mit Avidin/Biotin und (2.)

eine Blockierung mit Normalserum. Im ersten Blockierungsschritt wurde die Avidin/Biotin-Blockierung unter Verwendung des Avidin-Biotin-Blockierungskits der Firma Vector-Laboratories nach Herstellervorschrift durchgeführt, d.h. es wurde bei Raumtemperatur zunächst 15 Minuten mit der Avidin-Fertiglösung und nachfolgend 15 Minuten mit der Biotin-Fertiglösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 10 Vol.-% Normalserum in PBS (Normalserum der Spezies, aus der der Zweit-Antikörper stammt, hier Ziege-Normalserum; PBS = Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,2-7,4) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß an die Blockierung werden die Schnitte in PBS mit einem Gehalt an 5 µg/ml anti-Peptid-pKe#122-1 für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des nichtgebundenen Antikörpers werden die Schnitte anschließend in PBS mit einem Gehalt an 0,2 % (Gewicht/Volumen) bovinem Serumalbumin gewaschen. Es folgt die Inkubation mit einem beispielsweise Biotin-markierten und gegen Kaninchen-IgG-gerichteten Antikörper aus der Ziege (1:500 verdünnt in PBS/ 0,2% BSA; 30 Minuten bei Raumtemperatur), ein weiterer Waschschriff sowie die Aufbringung eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-markierten Streptavidins (1 : 1 000 in PBS/0,2 % BSA verdünnt). Anstelle von Cy3 kann auch ein anderer Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung des Streptavidins verwendet werden, z.B. FITC. Nach einem letzten Waschschriff werden die Schnitte mit Eindeckmedium, z.B. Elvanol oder Histogel, eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht und ausgewertet. In Fig.5 sind die Ergebnisse eines derart durchgeführten Immunfluoreszenznachweises gezeigt: Der anti- pKe#122-1 IgG Antikörper färbt auf Normalhautschnitten Keratinozyten im Bereich der epidermalen Basalmembranzzone an (Fig.5 A). Bei Färbung von Biopsien läsionaler Haut infolge der Erkrankungen Pemphigus vulgaris (Fig. 5 B), Bullösem Pemphigoid (Fig. 5 C) oder Psoriasis vulgaris (Fig. 5 D) zeigt sich eine auffällig starke Färbung in epidermalen Keratinozyten, insbesondere im Bereich epidermaler Läsionen. Dort hat demnach eine

verstärkte Expression und eine offensichtlichen Aufregulation des Proteins pKe#122 stattgefunden.

2. Immuno-Blot ("Western-Blot") und Dotblot

In Fig. 3 ist der Nachweis des pKe#122-Proteins mittels Westernblot-Verfahren unter Verwendung von anti-pKe#122-1 dargestellt. Hierfür wurden Zellysate der Keratinozytenlinie HaCaT (Proben "HaCaT") und von Keratinozytensheets 8 Stunden nach Dispasebehandlung (Proben "NHEK 8h") elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden nach Standardverfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde eine Inkubation mit 5 Gew.-% Milchpulver/TBS-Puffer durchgeführt. Anschließend wurden die (Protein-)Streifen mit der Bezeichnung "anti-122-1" in 3 %-Milchpulver/TBS-Puffer unter Zusatz von anti-pKe#122-1-Antikörpern (1 µg/ml) und die (Protein-)Streifen mit der Bezeichnung "rbIgG" in 3 %-Milchpulver/TBS-Puffer unter Zusatz von Kaninchen-Normal-IgG (1 µg/ml) jeweils bei 4°C für ca. 18 Stunden (über Nacht) inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde danach mit TBS/Tween- und TBS-Puffer gewaschen und mit einem Enzym-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper in 3%-Milchpulver/TBS-Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS/Tween und TBS wurden die gebundenen Antikörper mit einem peroxidase-spezifischen Lumineszenzsubstrat (hier beispielsweise das ECL-System der Firma Amersham-Buchler) sichtbar gemacht und autoradiographisch dargestellt. Auch eine alternative Markierung mit chromogenen Substraten ist gut möglich.

Die Zellysate können auch ohne vorhergehende elektrophoretische Auftrennung direkt auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und wie vorstehend beschrieben weiterbehandelt werden.

3. Enzyme-linked- immunosorbent-assay (ELISA)

Mikrotiterplatten werden mit rekombinantem pKe#122/GST-Fusionsprotein in unterschiedlichen Konzentrationen (10 - 0 ng/ml) beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden durch Behandlung mit 0,1 Gew.-% Gelatine in PBS (PBS/Gelatine) blockiert.

Anschließend werden die beschichteten Vertiefungen mit anti-pKe#122-1 IgG (1 µg/ml) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Fig. 6.A, geschlossene Kreise). Der Kontrollansatz erfolgt mit Kaninchen Normal-IgG in gleichen Konzentrationen (siehe Fig. 6.A, offene Kreise). Nach einem Waschschrift mit 0,05 Vol.-% Tween-20 in PBS (PBS/Tween) erfolgt eine Inkubation mit Peroxidase-markiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:10 000 in PBS/Tween). Nach einem weiteren Waschschrift zur Entfernung ungebundener enzymmarkierter Antikörper wird das farblose Peroxidase-Substrat Ortho-Phenylendiamin zugesetzt, welches durch die Peroxidase in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Anstelle von Ortho-Phenylendiamin sind auch andere Peroxidasesubstrate mit Farbumschlag einsetzbar. Die Quantifizierung der Farbbildung und damit des gebundenen Antikörpers erfolgt durch Absorptionsmessung in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 490 gegen 405 nm (Ordinate). Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Fig. 6.A dargestellt. Es zeigt, daß die Farbkonzentration der Menge des an die Platte gebundenen pKe#122-Fusionsproteins proportional ist. Daraus folgt, daß bei Einsatz von Proben bekannter Antigenkonzentrationen, sog. Standards, durch Vergleich die Quantifizierung einer unbekannten Antigenmenge möglich ist.

Zur Quantifizierung des pKe#122-Proteins in komplexen Lösungen wird die Durchführung eines Sandwich-ELISA (Fig. 6.B) bevorzugt. Hierzu wird eine Mikrotiterplatte mit einem gegen pKe#122 gerichteten Antikörper (z.B. Kaninchen anti-pKe#122/GST-Fusionsprotein, 1 µg/Vertiefung) beschichtet. Dann werden die noch verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen der Mikrotiterplatte mit PBS/Gelatine blockiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen des pKe#122/GST-Proteins (10 - 0 ng/ml) in Ansatz gebracht. Nach einem Waschschrift mit PBS/Tween wird die Platte mit einem zweiten Peroxidase-markierten anti-pKe#122-Antikörper (z.B. peroxidase-markiertem Kaninchen anti-pKe#122-1 (Peptid)-Antikörper) inkubiert (z.B. eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur). "Peroxidase" steht hier stellvertretend für praktisch jede beliebige Markierung des Antikörpers, z.B. mit Enzymen, Fluoreszenzmolekülen oder Lumineszenzmolekülen. Nach einem weiteren Waschschrift zur Entfernung ungebundener enzymmarkierter Antikörper wird das farblose Peroxidase-Substrat Ortho-Phenylendiamin zugesetzt, welches durch die

Peroxidase-Aktivität in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Quantifizierung der Farbbildung erfolgt durch Absorptionsmessung in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 490 gegen 405 nm (Ordinate). Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in **Fig. 6.B** dargestellt. Es zeigt, daß die Farbkonzentration der Menge des an die Platte gebundenen pKe#122 proportional ist. Durch dieses Testverfahren ist folglich eine Quantifizierung der unbekannten Menge des pKe#122 in einer Probe möglich. Dabei steht die Substanz Ortho-Phenylendiamin hier stellvertretend für jedes beliebige Peroxidase-Substrat, das infolge der Peroxidase-Aktivität seine Farbe nachweisbar ändert.

Anstelle des hier beispielhaft verwendeten polyklonalen Antikörpers "anti-pKe#122-1" können ebenso gut monoklonale Antikörper, die gegen das Protein pKe#122 gerichtet sind, eingesetzt werden, und zwar sowohl im einfachen ELISA (= Enzyme linked immunosorbent assay) als auch im Sandwich-ELISA.

Beispiel 4: Nachweis pKe#122-spezifischer mRNA in Zellen mittels reverser

Polymerasekettenreaktion

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde pKe#122-spezifische RNA in Zellen von Keratinozytensheets (NHEK) nach Dispasebehandlung und in HaCaT-Zellen nachgewiesen. Hierfür wurde RNA aus Zellen von Keratinozytensheets (NHEK) nach Dispasebehandlung und unterschiedlich langer weiterer Inkubationszeiten und aus HaCaT-Zellen jeweils mit Standardmethoden (Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode, siehe auch Beispiel 1A) isoliert und in cDNA nach Standardmethoden umgeschrieben. Diese cDNA wurde einer PCR unterzogen, bei der aus der pKe#122-spezifischen cDNA ein Teilfragment von ≈ 350 kb amplifiziert wurde. Als Primer-Paar wurde eine Kombination aus den Primern "pKe#122-forward 3" (tgagcaggcgctgggtatcatgcag) und "pKe#122-reverse 2" (tcaccgggaacaagaaggccacct) eingesetzt. Es wurden 10 ng cDNA mit je 10 μ M Primer zusammen mit einem Gemisch aus hitzestabiler DNA-Polymerase, ATP, TTP, GTP, CTP und Polymerasepuffer (vgl. z.B.: *Current protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons. Inc, Suppl. 37, Chapter 15), hier im Beispiel in Form des im Handel gebrauchsfertig

erhältlichen "PCR-Master-Mix" der Firma Clontech, in Ansatz gebracht. Zusätzlich wurden folgende Kontrolluntersuchungen durchgeführt: 1. der vorstehend beschriebene Ansatz mit dem Plasmid pUEX-1/pKe#122 anstelle der cDNA, 2. die Kit-interne Positivkontrolle, 3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz ohne Zusatz von cDNA (Negativkontrolle 1), 4. der vorstehend beschriebene Ansatz mit cDNA aus Zellen von Keratinozytensheets (NHEK) 2 Stunden nach Dispasebehandlung, ohne Zusatz von Primern (Negativkontrolle 2). Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Fig. 7 zeigt das Ergebnis dieser Auftrennung. Es gilt: Spur 1 = Molekulargewichts-Marker, Spur 2 = NHEK T0, Spur 3 = NHEK T2, Spur 4 = NHEK T4, Spur 5 = NHEK T8, Spur 6 = HaCaT, Spur 7 = frei, Spur 8 = Positivkontrolle (pUEX-1; mit pKe#122 als Insert), Spur 9 = Negativkontrolle (Ansatz mit cDNA ohne Primer), Spur 10 = Kit-spezifische Positivkontrolle zur Funktionskontrolle der PCR, Spur 11 = Negativkontrolle (Ansatz mit Primer ohne cDNA), Spur 12 = Molekulargewichts-Marker. Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ≈ 350 kb wurde in den Spuren 3, 4, 5, 6 und 8 nachgewiesen, das heißt: pKe#122-spezifische mRNA wurde in Zellen von Keratinozytensheets zum Zeitpunkt 2 (T2), 4 (T4) und 8 (T8) Stunden nach dispase-induzierter Ablösung und ebenso in HaCaT-Zellen nachgewiesen.

Diese Technik ermöglicht den Nachweis der pKe#122-Expression auch in den Fällen, in denen der Nachweis des pKe#122-Proteins aufgrund zu niedrigen Expressionsspiegels mit immunhistologischen Methoden, dem ELISA-, Dotplot- oder Westernblot-Verfahren nicht gelingt.

Beispiel 5: Herstellung von Vektormolekülen mit der Fähigkeit zur Expression des Proteins pKe#122 in prokaryontischen bzw. eukaryontischen Zellen

Zur Herstellung bzw. Expression des rekombinanten pKe#122-Proteins wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurden zwei pKe#122-Gluthathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine, pKe#122/GST-I und pKe#122/GST-II, (Vektor pGEX; siehe Fig. 8) zu dem Zweck der Expression in Bakterien (*E. coli* DH5 α) hergestellt. Zum anderen wurde

ein pKe#122-FLAG-Fusionsprotein (Vektor pBK-CMV; siehe Fig. 9) zu dem Zweck der Expression in eukaryontischen Zellen (cos-Zellen) hergestellt.

Die pKe#122-Gluthathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteine wurden in *E. coli* (DH5 α) durch IPTG-Induktion zur Expression gebracht. Nach der Induktion wurde das bakterielle Lysat im Westernblot mit anti-GST-Antikörpern untersucht, und zwar im Vergleich zu pKe#122-Gluthathion-S-Transferase (GST)-Vektor tragendem, nicht-induziertem Bakterienlysat sowie zu Lysat von Bakterien, die ausschließlich GST exprimierten. Das Produkt dieses Westernblots ist in Fig. 10.A abgebildet: Spur (a) zeigt die Kontroll-Transfektante (GST ohne Insert) vor IPTG-Induktion, Spur (b) zeigt die Kontroll-Transfektante (GST ohne Insert) nach IPTG-Induktion, Spur (c) zeigt pKe#122/GST-I vor IPTG-Induktion, Spur (d) zeigt pKe#122/GST-I nach IPTG-Induktion, Spur (e) zeigt pKe#122/GST-II vor IPTG-Induktion, und Spur (f) zeigt pKe#122/GST-II nach IPTG-Induktion.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, war ein Gemisch unterschiedlich großer GST-positiver Banden nachweisbar und zwar ausschließlich nach IPTG-Induktion. Die höchstmolekulare Bande hatte ein Molekulargewicht von ca. 100 kD (Fraktion 85), die niedrigstmolekulare Bande von ca. 26 kD, was dem Molekulargewicht des reinen GST-Proteins entspricht. Die genannten Daten weisen darauf hin, daß es in *E. coli* zu einem Abbau des rekombinanten pKe#122-GST-Fusionsproteins kommt. Die exprimierten Fusionsproteine (Spur d) lagen als unlösliche Proteinaggregate in den sog. "inclusion bodies" vor, weshalb eine Aufreinigung mittels Prep-Cell durchgeführt wurde. Die Fraktionen dieser PrepCell-Reinigung wurden dann mittels Standardverfahren elektrophoretisch aufgetrennt und mittels des bereits oben beschriebenen Immuno-Blot Verfahrens mit anti-GST-Antikörpern analysiert. Das Produkt dieses Aufreinigungsverfahrens ist in Fig. 10 B abgebildet. Die Aufreinigung ergab ein Gemisch unterschiedlich großer GST-Fusionsproteine. Die stärkste Bande, d.h. die Mehrzahl der GST-Fusionsproteine, wies ein apparentes Molekulargewichtsmarker von 65 kD auf. Das erlaubt den Schluß, daß das 65 kD pKe#122-GST-Fusionsprotein aus dem GST-Protein und einem ca. 40 kD großen Fragment des Proteins pKe#122 besteht. Das 65 kD

pKe#122/GST-Fusionsprotein wurde zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums in Kaninchen herangezogen. Die Herstellung und Charakterisierung der Antikörper erfolgte wie in Beispiel 2 für die anti-Peptid-Antikörper beschrieben

Die höchstmolekulare Bande hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 100 kD (vgl. Abb. 10 B, Fraktion 85). Das erlaubt den Schluß, daß das 100 kD pKe#122-GST-Fusionsprotein aus dem GST-Protein und einem ca 70-75 kD großen Fragment des Proteins pKe#122 besteht (vgl. auch Fig. 4 und dazugehörige Beschreibung in Beispiel 2).

Im eukaryontischen System wurde der pBK-CMV-pKe#122-Vektor (Fig. 9) in sog. Cos-Zellen, d.h. in Zellen der im Stand der Technik allgemein bekannten Cos-Zelllinie, transformiert. Die Cos-Zellen wurden nach Standardverfahren durch Behandlung mit DEAE-Dextran/Chloroquin zur Aufnahme der Plasmid-DNA gebracht. Danach wurden die transformierten Zellen zwei Tage unter Standardbedingungen (37 °C und 7 % CO₂) inkubiert. Die Cos-Zellen wurden lysiert und im Immuno-Blot-Verfahren analysiert unter Verwendung eines Antikörpers gegen das FLAG-Epitop bzw. des anti-Peptid-Antikörpers anti-pKe#122-1 IgG. Fig. 11 zeigt das Produkt des Immuno-Blots: Spur a zeigt die nichttransfizierten Cos-Zellen, Spur b zeigt ein FLAG-Kontrollprotein und Spur c zeigt mit pKe#122-FLAG Vektorkonstrukt transfizierte Cos-Zellen. Die Spur c weist eine Bande mit einem ungefähren Molekulargewicht von 80 kD auf, die von dem anti-FLAG-Antikörper angefärbt wurde. Spur b zeigt ein FLAG-markiertes Kontrollprotein, das die Funktionalität des anti-FLAG-Antikörpers demonstriert.

Beispiel 6: Beeinflussung von Keratinozyten durch pKe#122-spezifische Antisense-Oligonukleotide

Antisense-Nukleotide werden von Zellen, auch Keratinozyten, aufgenommen (vgl. G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 24, C1115-C1119) und binden an die in der Zelle vorliegende mRNA und hemmen deren Translation und damit die Expression (vgl. Y.-S. Lee, et al. 1997: *Definition by specific*

antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C α in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes, Molecular Carcinogenesis 18, S. 44-53). Geeignete Antisense-Oligonukleotide wurden anhand der pKe#122-spezifischen Nukleotidsequenz (SEQ NO:1) hergestellt. Sie wurden mit geeignetem Puffermedium (sog. "Oligopuffer") auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. HaCaT-Zellen wurden bei 37 °C und 7 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Die Zellen wurden abtrypsiniert (10 Minuten 0.2 % EDTA, 5 - 10 Minuten 0,1 % Trypsin) und auf eine Konzentration von 25 000 Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer 96-well-Platte wurden 100 μ l Zellsuspension (entspricht 2 500 Zellen) einpipettiert. Die Zellen wurden 1 Stunde inkubiert, danach erfolgte die Zugabe des Antisense-Oligonukleotids (2 μ l einer 100 μ M-Lösung) und eine weitere Inkubation von 24-48 Stunden. Als Negativkontrolle dienten Zellansätze, denen Oligonukleotid mit der gleichen Basenverteilung aber zufällig ausgewählter Sequenz zugegeben wurden.

Die solcherart behandelten Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroskops hinsichtlich phänotypischer Veränderungen in den Zellen untersucht. Das Ergebnis der mikroskopischen Analyse ist in Fig. 12 und Fig. 13 dargestellt: Fig. 12 a zeigt subkonfluente HaCaT-Kulturen, die mit pKe#122-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden sind, Fig. 12 b zeigt subkonfluente HaCaT-Kulturen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden sind, Fig. 13 a zeigt konfluente HaCaT-Kulturen, die mit pKe#122-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden sind, Fig. 13 b zeigt konfluente HaCaT-Kulturen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden sind, und Fig. 13 c zeigt einen Detailausschnitt aus Fig. 13 a.

Die mikroskopischen Untersuchungsergebnisse demonstrieren, daß im Vergleich zu Kontroll-Oligonukleotiden die Anzahl der Zellen in den mit dem spezifischen Antisense-Oligonukleotid behandelten Kulturen deutlich reduziert ist. Das läßt auf eine durch das antisense-Oligonukleotid verursachte Verminderung der zellulären Proliferation schließen. Nach Erreichen der Konfluenz fanden sich in den mit antisense-Oligonukleotiden behandelten HaCaT-Kulturen stark vergrößerte Zellen, die in den mit

Kontroll-Oligonukleotiden behandelten Kulturen nicht zu finden waren. Diese großen Zellen entsprechen in ihrer Morphologie differenzierten Keratinozyten. Der Befund läßt darauf schließen, daß mit pKe#122-spezifischen antisense-Oligonukleotiden behandelte Zellen eine vermehrte Tendenz zur Differenzierung aufweisen.

Zusammengefaßt führt die Behandlung mit pKe#122-spezifischen Oligonukleotiden zu einer deutlichen Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung.

A n s p r ü c h e

1. Isoliertes Polypeptid,
das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im
aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich
ist, und
das die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein
durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion daraus entstandenes
Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz aufweist.
2. Isolierte Nukleinsäure
die ein Protein codiert,
das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden
und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder
ähnlich ist,
die entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz
oder die hierzu komplementäre Nukleotidsequenz
oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen
oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierende
Nukleotidsequenz aufweist.
3. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß diese Nukleinsäure aus einer natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen
Quelle gewonnen ist.
4. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet,
daß diese Nukleinsäure eine cDNA ist.

5. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure ein Sense- oder Antisense-Oligonukleotid ist, das mindestens 6, vorzugsweise 8 bis 25 Nukleotide umfaßt und mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleotidsequenz oder Teilsequenzen davon hybridisiert.

6. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine Splice-Variante ist, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleotidsequenz hybridisiert.
7. Isoliertes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert, welche
 - entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz
 - oder die hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen
 - oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist.
8. Rekombinantes DNS-Vektormolekül, das eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 umfaßt, und das die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweist.
9. Rekombinantes DNS-Vektormolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Vektormolekül das Plasmid pUEX-1 oder pGEX-2T oder pBK-CMV oder pHR 2 ist.

10. Transformierte Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 enthält, welche mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in der Wirtszelle natürlicherweise oder als Folgen einer Rekombination enthalten ist, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, aufweist.

11. Transformierte Wirtszelle nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor der Zytokeratin-14-Promotor und die Wirtszelle ein Keratinozyt ist, oder daß der Promotor der CMV-Promotor und die Wirtszelle eine Cos-Zelle ist.
12. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder eines Vektormoleküls nach Anspruch 8 zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.
13. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 7 zur Herstellung eines Antikörpers gegen dieses Polypeptid und/oder damit verwandte Proteine.
14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis eingesetzt wird.
15. Antikörper, der spezifisch mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 7 reagiert.

16. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 15 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung der Epidermis.
-
17. Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#122, dadurch gekennzeichnet,
daß das Reagenz wenigstens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 7 umfaßt.
 18. Verwendung eines Sense- oder Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 5 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis.
 19. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 7 oder einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 zur Identifizierung von medizinisch, kosmetisch oder pharmakologisch einsetzbaren Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen/deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere als Inhibitoren oder Aktivatoren wirken.

SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Dr. Michael Kramer
STRASSE: Bergstraße 85
ORT: Pfungstadt
BUNDESLAND: Hessen
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 64319

VERTRETER:

NAME: Dr. Ulrike Rudolph
STRASSE: In der Schanz 10
ORT: Schriesheim
BUNDESLAND: Baden-Württemberg
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 69198
VERTRETERNUMMER: 246 263
AKTENZEICHEN: km-1

TELEKOMMUNIKATION:

TELEFON: 06203-61348
TELEFAX: 06203-64196

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Regulatorisches Protein aus humanen Keratinozyten

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM-kompatibler PC
BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
SOFTWARE: Microsoft WORD für Windows 6.0

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE:

2533 Basenpaare

ART:

Desoxyribonukleinsäure

TOPOLOGIE:

linear

ART DES MOLEKÜLS:

cDNA

HYPOTHETISCH:

nein

ANTI-SENSE:

nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

Homo sapiens

STAMM:

kaukasisch

ENTWICKLUNGSSTADIUM:

adult

ZELLTYP:

epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

cDNA aus Keratinozyten

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL:

kodierende Sequenz für
regulatorisches Protein aus
humanen Keratinozyten

LAGE:

von 1 bis 2533

ERMITTLUNGSMETHODE:

cDNA-Sequenzierung

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO: 1

1	GGCACCCAGG	TGCGCGCGGA	GCCATGGTTA	TCATGTCGGA	G TTCAGCGCG
51	GACCCCGCGG	GCCAGAGTCA	GGGCCAGCAG	AAGCCCCTCC	GGGTGGGTTT
101	TTACGACATC	GAGCGGACCC	TGGGCAAAGG	CAACTTCGCG	GTGGTGAAGC
151	TGGCGCGGCA	TCGAGTCACC	AAAACGCAGG	TTGCAATAAA	AATAATTGAT
201	AAAACACGAT	TAGATTCAAG	CAATTTGGAG	AAAATCTATC	GTGAGGTTCA
251	GCTGATGAAG	CTTCTGAACC	ATCCACACAT	CATAAAGCTT	TACCAGGTTA
301	TGGAAACAAA	GGACATGCTT	TACATCGTCA	CTGAATTTGC	TAAAAATGGA
351	GAAATGTTTG	ATTATTTGAC	TTCCAACGGG	CACCTGAGTG	AGAACGAGGC
401	GCGGAAGAAG	TTCTGGCAAA	TCCTGTCGGC	CGTGGAGTAC	TGTCACGACC
451	ATCACATCGT	CCACCGGGAC	CTCAAGACCG	AGAACCTCCT	GCTGGATGGC
501	AACATGGACA	TCAAGCTGGC	AGATTTTGGA	TTTGGAATT	TCTACAAGTC
551	AGGAGGCCT	CTGTCCACGT	GGTGTGGGAG	CCCCCGTAT	GCCGCCCGG
601	AAGTCTTTGA	GGGGAAGGAG	TATGAAGGCC	CCCAGCTGGA	CATCTGGAGC
651	CTGGGCGTGG	TGCTGTACGT	CCTGGTCTGC	GGTTCTCTCC	CCTTCGATGG
701	GCCTAACCTG	CCGACGCTGA	GACAGCGGGT	GCTGGAGGGC	CGCTTCCGCA
751	TCCCCTTCTT	CATGTCTCAA	GACTGTGAGA	GCCTGATCCG	CCGCATGCTG
801	GTGGTGGACC	CCGCCAGGCG	CATCACCATC	GCCCAGATCC	GGCAGCACC
851	GTGGATGCGG	GCTGAGCCCT	GCTTGCCGGG	ACCCGCCTGC	CCCGCCTTCT
901	CCGCACACAG	CTACACCTCC	AACCTGGGCG	ACTACGATGA	GCAGGCGCTG
951	GGTATCATGC	AGACCCTGGG	CGTGGACCGG	CAGAGGACGG	TGGAGTCACT
1001	GCAAAACAGC	AGCTATAACC	ACTTTGCTGC	CATTTATTAC	CTCCTCCTTG
1051	AGCGGCTCAA	GGAGTATCGG	AATGCCCAGT	GCGCCCGCCC	CGGGCCTGCC
1101	AGGCAGCCGC	GGCCTCGGAG	CTCGGACCTC	AGTGGTTTGG	AGGTGCCTCA
1151	GGAAGGTCTT	TCCACCGACC	CTTTCCGACC	TGCCTTGCTG	TGCCCGCAGC
1201	CGCAGACCTT	GGTGCAGTCC	GTCCTCCAGG	CCGAGATGGA	CTGTGAGCTC
1251	CAGAGCTCGC	TGCAGTGGCC	CTTGTTCTTC	CCGGTGGATG	CCAGCTGCAG
1301	CGGAGTGTTT	CGGCCCCGGC	CCGTGTCCCC	AAGCAGCCTG	CTGGACACAG
1351	CCATCAGTGA	GGAGGCCAGG	CAGGGGCCGG	GCCTAGAGGA	GGAGCAGGAC
1401	ACGCAGGAGT	CCCTGCCCAG	CAGCACGGGC	CGGAGGCACA	CCCTGGCCGA
1451	GGTCTCCACC	CGCCTCTCCC	CACTCACCGC	GCCATGTATA	GTCGTCTCCC
1501	CCTCCACCAC	GGCAAGTCCT	GCAGAGGGAA	CCAGCTCTGA	CAGTTGTCTG
1551	ACCTTCTCTG	CGAGCAAAAG	CCCCGCGGGG	CTCAGTGGCA	CCCCGGCCAC
1601	TCAGGGGCTG	CTGGGCGCCT	GCTCCCCGGT	CAGGCTGGCC	TCGCCCTTCC
1651	TGGGGTCGCA	GTCCGCCACC	CCAGTGCTGC	AGGCTCAGGG	GGGCTGGGA
1701	GGAGCTGTTT	TGCTCCCTGT	CAGCTTCCAG	GAGGGACGGC	GGGCGTCGGA
1751	CACCTCACTG	ACTCAAGGGC	TGAAGGCCTT	TCGGCAGCAG	CTGAGGAAGA
1801	CCACGCGGAC	CAAAGGGTTT	CTGGGACTGA	ACAAAATCAA	GGGGCTGGCT
1851	CGCCAGGTGT	GCCAGGTCCC	TGCCAGCCGG	GCCAGCAGGG	GCGGCCCTGAG
1901	CCCCTTCCAC	GCCCCTGCAC	AGAGCCCAGG	CCTGCACGGC	GGCGCAGCCG
1951	GCAGCCGGGA	GGGCTGGAGC	CTGCTGGAGG	AGGTGCTAGA	GCAGCAGAGG
2001	CTGCTCCAGT	TACAGCACCA	CCCGGCCGCT	GCACCCGGCT	GCTCCCAGGC
2051	CCCCCAGCCG	GCCCCTGCCC	CGTTTGTGAT	CGCCCCCTGT	GATGGCCCTG
2101	GGGCTGCCCC	GCTCCCCAGC	ACCCTCCTCA	CGTCGGGGCT	CCCGCTGCTG
2151	CCGCCCCCAC	TCCTGCAGAC	CGGCGCGTCC	CCCGTGGCCT	CAGCGGCGCA
2201	GCTCCTGGAC	ACACACCTGC	ACATTGGCAC	CGGCCCCACC	GCCCTCCCCG
2251	CTGTGCCCCC	ACCACGCCTG	GCCAGGCTGG	CCCCAGGTTG	TGAGCCCCCTG
2301	GGGCTGCTGC	AGGGGGACTG	TGAGATGGAG	GACCTGATGC	CCTGCTCCCT
2351	AGGCACGTTT	GTCCTGGTGC	AGTGAGGGCA	GCCCTGCATC	CTGGCACGGA
2401	CACTGACTCT	TACAGCAATA	ACTTCAGAGG	AGGTGAAGAC	ATCTGGCCTC
2451	AAAGCCAAGA	ACTTTCTAGA	AGCGAAATAA	GCAATACGTT	AGGTGTTTTG
2501	GCGAAAAAAA	AAAAA	AAAAA	AAA	

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 790 Aminosäuren
ART: Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS:

Protein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens
STAMM: kaukasisch
ENTWICKLUNGSSTADIUM: adult
ZELLTYP: epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: kodierende Sequenz für
regulatorisches Protein aus
humanen Keratinozyten

LAGE:

von 1 bis 790

ERMITTLUNGSMETHODE:

Ableitung aus cDNA-Sequenz

SONSTIGE ANGABEN:

umfaßt ein Serin/Threonin-Kinase-Motiv,
vier Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive
und eine Kinase-Domäne mit
ATP-Bindungsstelle

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO: 2

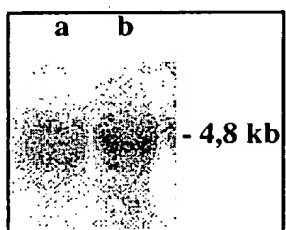
1	HPGARGAMVI	MSEFSADPAG	QSQGQOKPLR	VGFYDIERTL	GKGNFAVVKL
51	ARHRVTKTQV	AIKIIDKTRL	DSSNLEKIYR	EVQLMKLLNH	PHI IKLYQVM
101	ETKDMLYIVT	EFAKNGEMFD	YLTSNGHLSE	NEARKKFWQI	LSAVEYCHDH
151	HIVHRDLKTE	NLLLDGNMDI	KLADFGFGNF	YKSGEPLSTW	CGSPPYAAPE
201	VFEGKEYEGP	OLDIWSLGVV	LYVLVCGSLP	FDGPNLPTLR	QRVLEGRFRI
251	PFFMSQDCES	LIRRMLVVDP	ARRITIAQIR	QHRWMRAEPC	LPGPACPAFS
301	AHSYTSNLGD	YDEQALGIMQ	TLGVDRQRTV	ESLQNSSYNH	FAAIYYLLE
351	RLKEYRNAQC	ARPGPARQPR	PRSSDLSGLE	VPQEGNSTDP	FRPALLCPQP
401	QTLVQSVLQA	EMDCELQSSL	QWPLFFPVDA	SCSGVFRPRP	VSPSSLLDTA
451	ISEEARQGP	LEEEQDTQES	LPSSTGRRHT	LAEVSTRISP	LTAPCIVVSP
501	STTASPAEGT	SSDSCLTFSA	SKSPAGLSGT	PATQGLLGAC	SPVRLASPFL
551	GSQSATPVLQ	AQGGLGGAVL	LPVSFQEGRR	ASDTSLTQGL	KAFRQQLRKT
601	TRTKGFLGLN	KIKGLARQVC	QVPASRASRG	GLSPFHAPAQ	SPGLHGGAAG
651	SREGWSLLEE	VLEQQRLLQL	QHHPAAAPGC	SQAPQPAPAP	FVIAPCDGPG
701	AAPLPSTLLT	SGLPLLPPPL	LQTGASPVAS	AAQLLDTHLH	IGTGPTALPA
751	VPPPRLARLA	PGCEPLGLLQ	GDCEMEDLMP	CSLGT FVLVQ	

Tabelle 1

Charakterisierung der Anti-Peptid-Antikörper. Aus den jeweiligen Seren wurde die IgG-Fraktion mittels Ammoniumsulfat-Fällung angereichert. Die jeweiligen IgG-Präparationen wurden mit dem korrespondierenden und den irrelevanten Peptiden in einem Peptid-ELISA ausgetestet. In einem weiteren Schritt wurde die IgG-Präparation auch auf dem gereinigten Fusionsprotein GST-pKe#122-1 im Immuno-Blot getestet.

IgG-Präparation	Reaktivität im Peptid-ELISA	Reaktivität im Immuno-Blot (mit GST-pKe#122-I)
anti-Peptid#122-1	+	+
anti-Peptid#122-2	+	-
anti-Peptid#122-3	-	n.d.
anti-Peptid#122-4	+	-

"+" = Reaktivität; "-" = keine Reaktivität; "n.d." = nicht durchgeführt; *) siehe auch Fig. 4.

**Fig. 1**

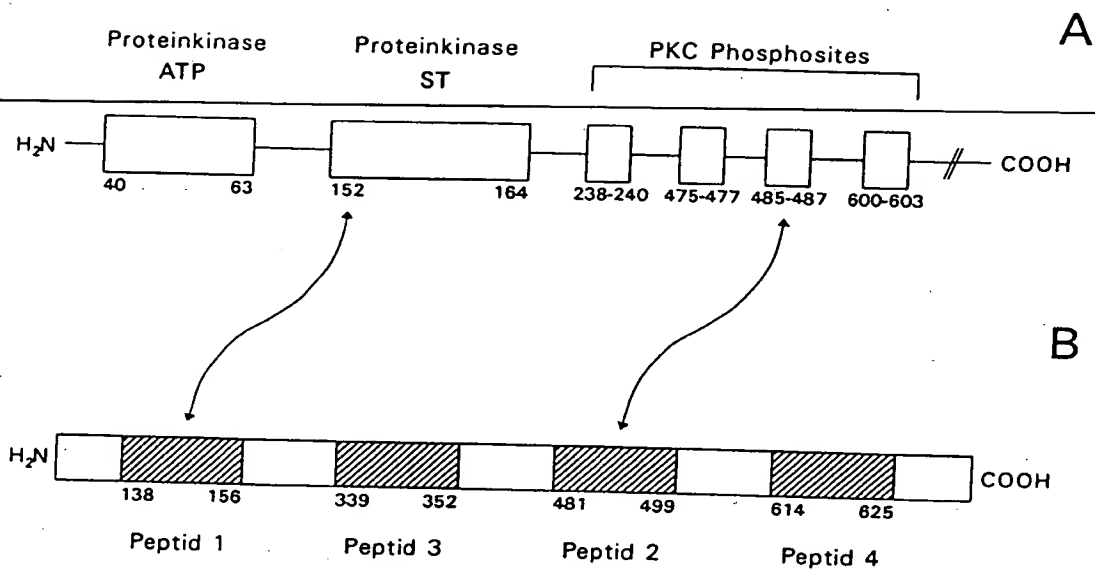


Fig. 2

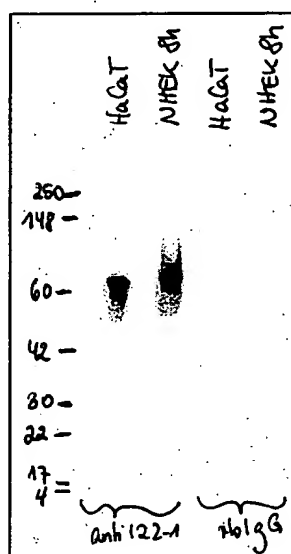
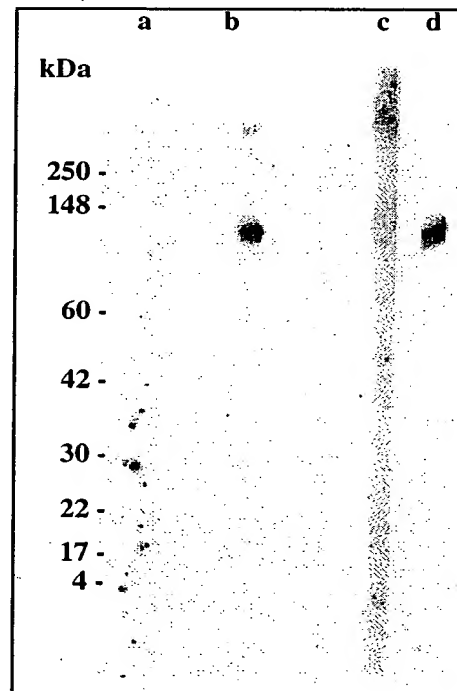


Fig. 3

**Fig. 4**

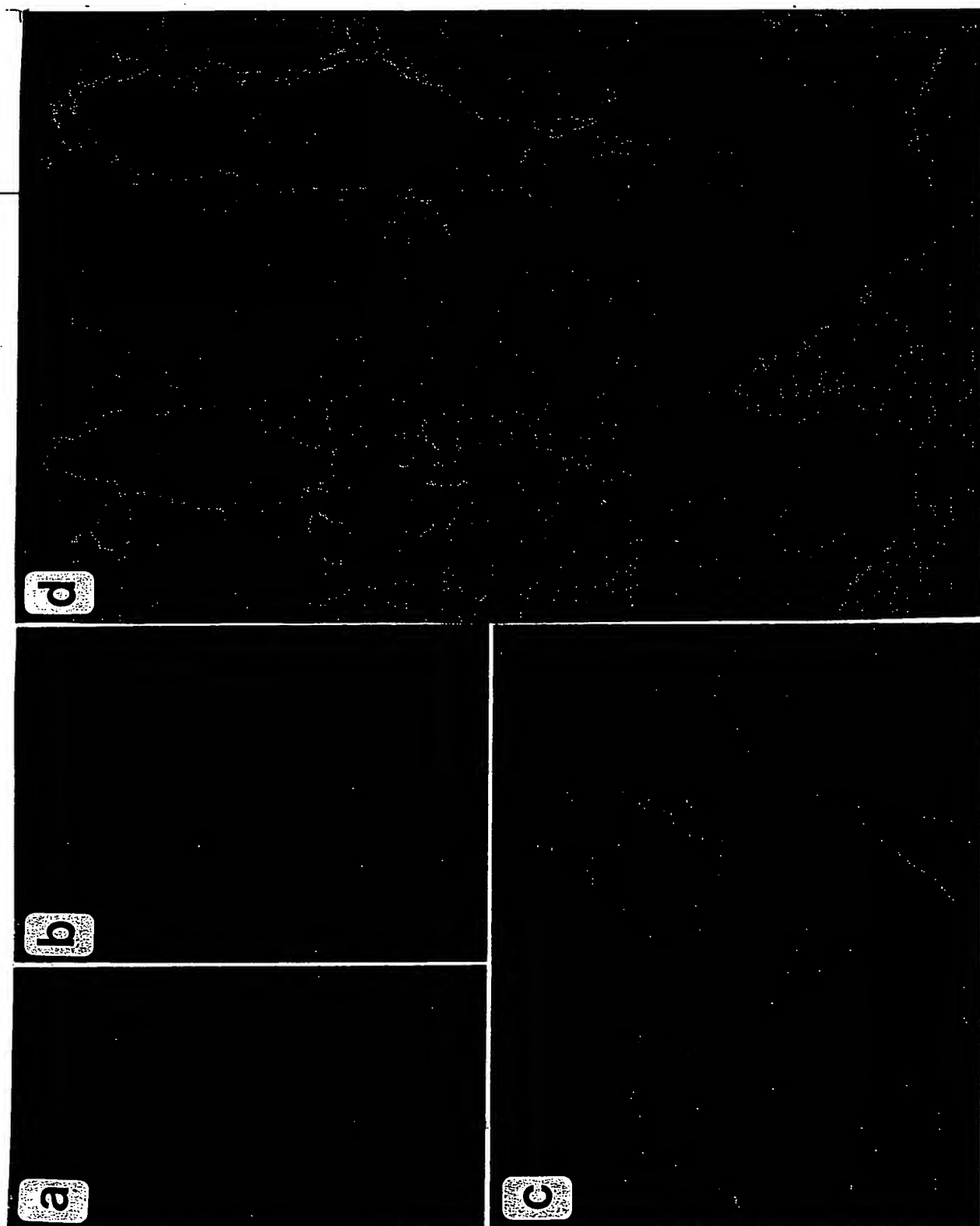


Fig. 5

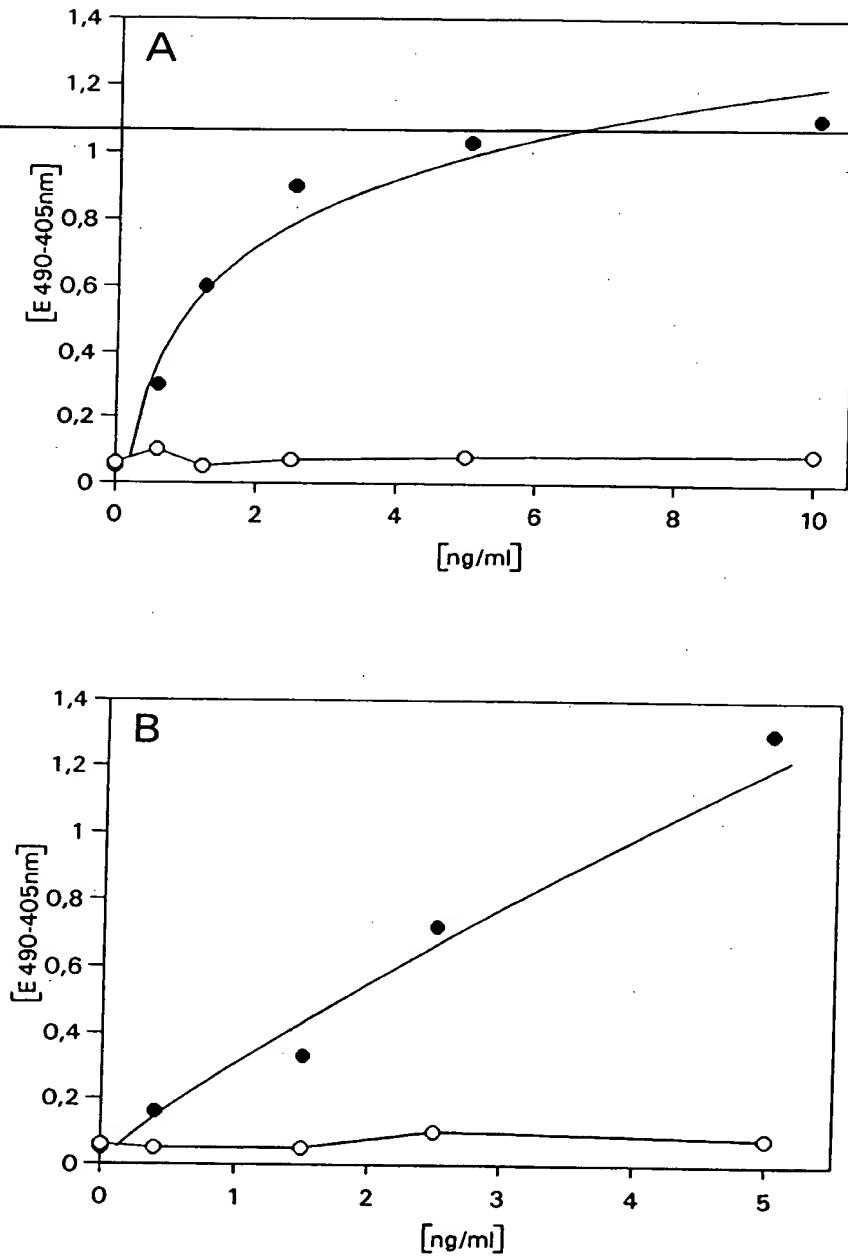


Fig. 6

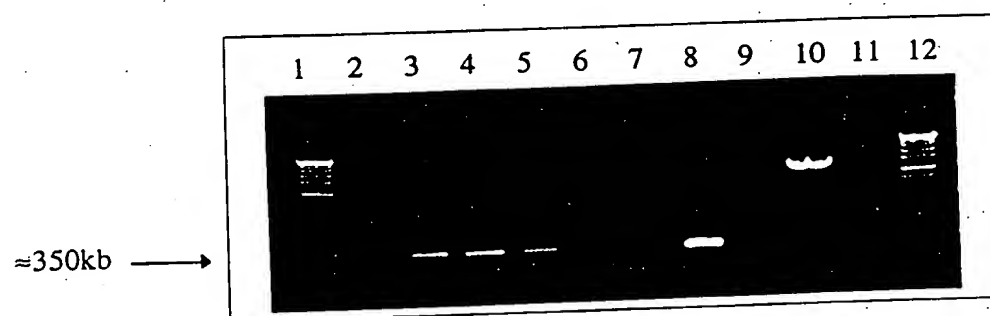


Fig. 7

BamH1 pKe#122/GST-I: bp 287-2339 EcoR1
pKe#122/GST-II: bp 287-1094

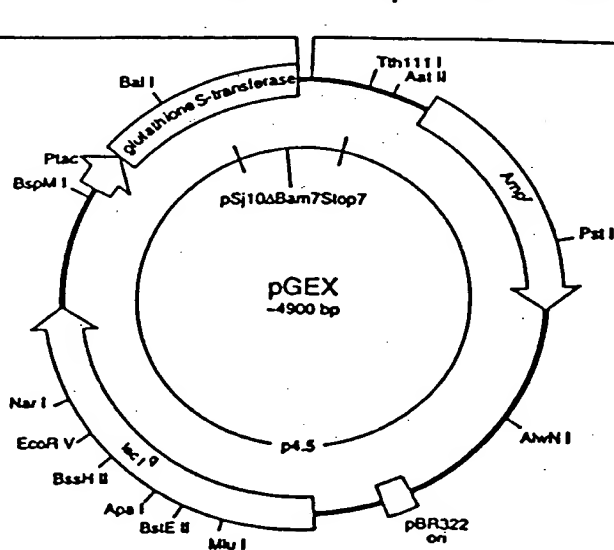


Fig.8

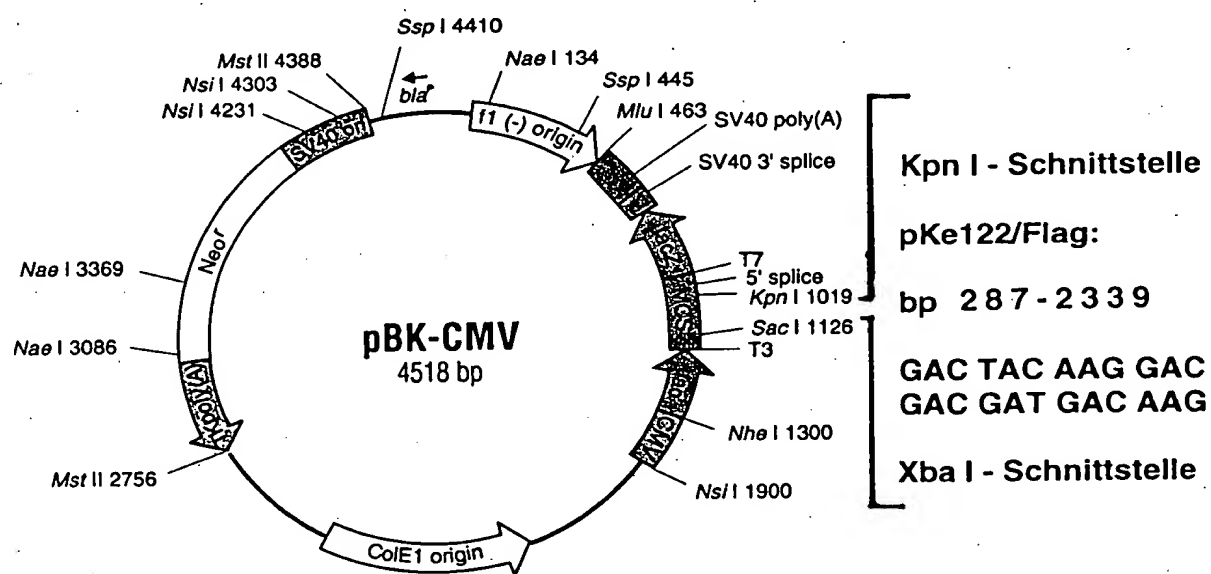


Fig. 9

19.09.98

48

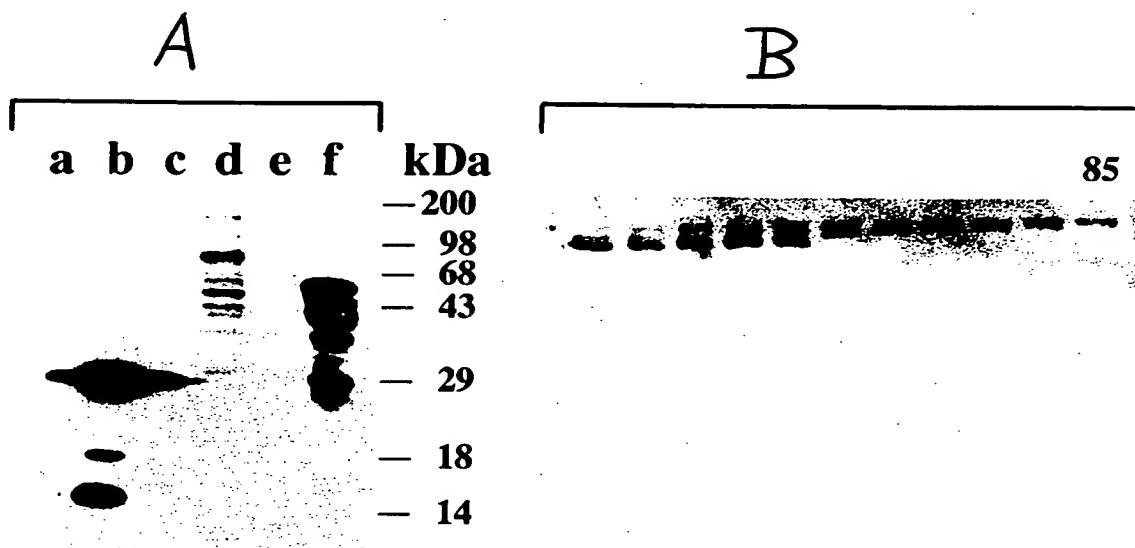


Fig. 10

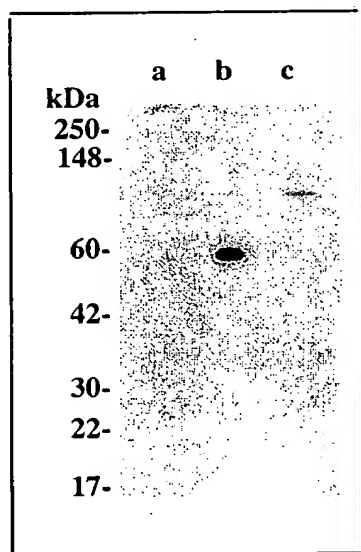


Fig.11

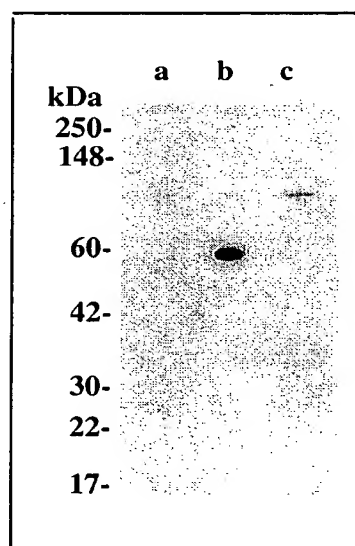


Fig.11

19.0.98

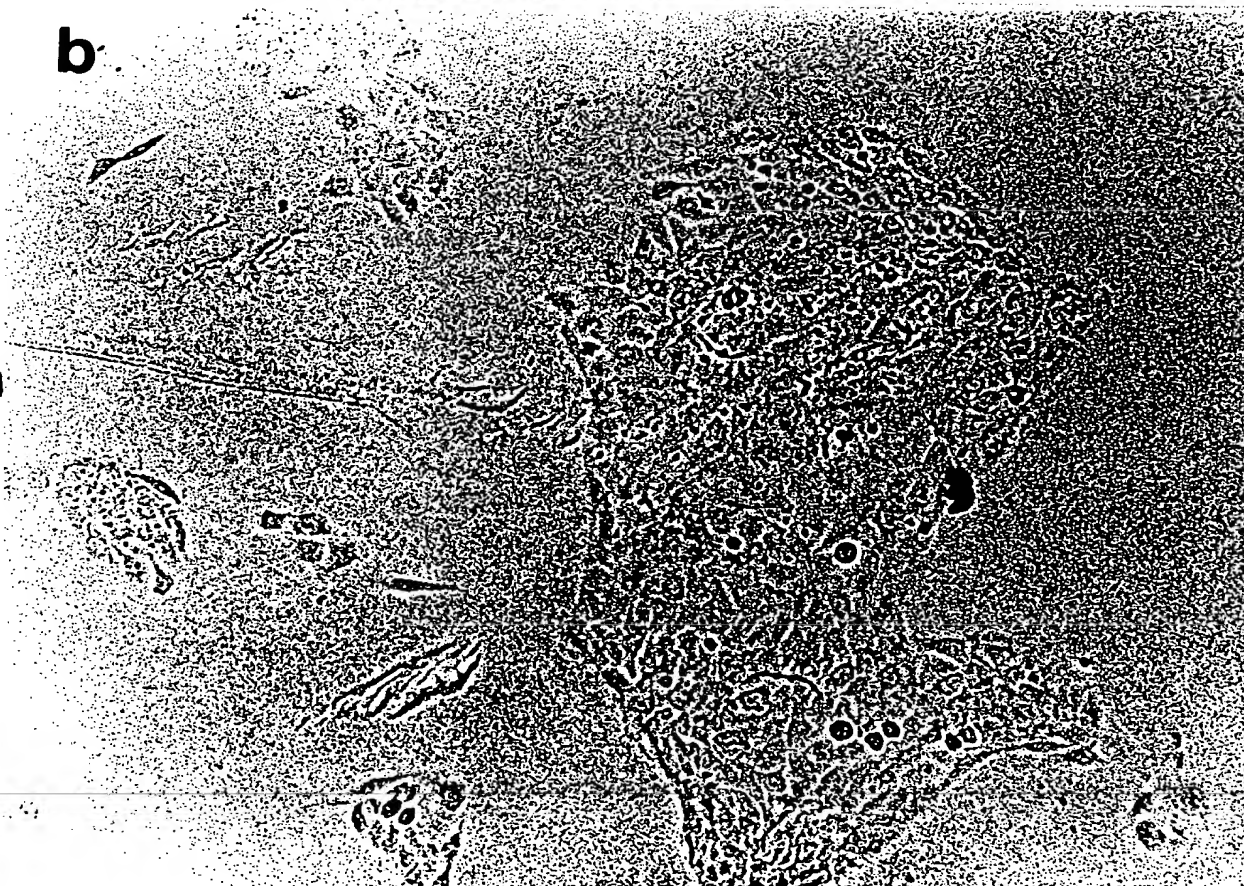
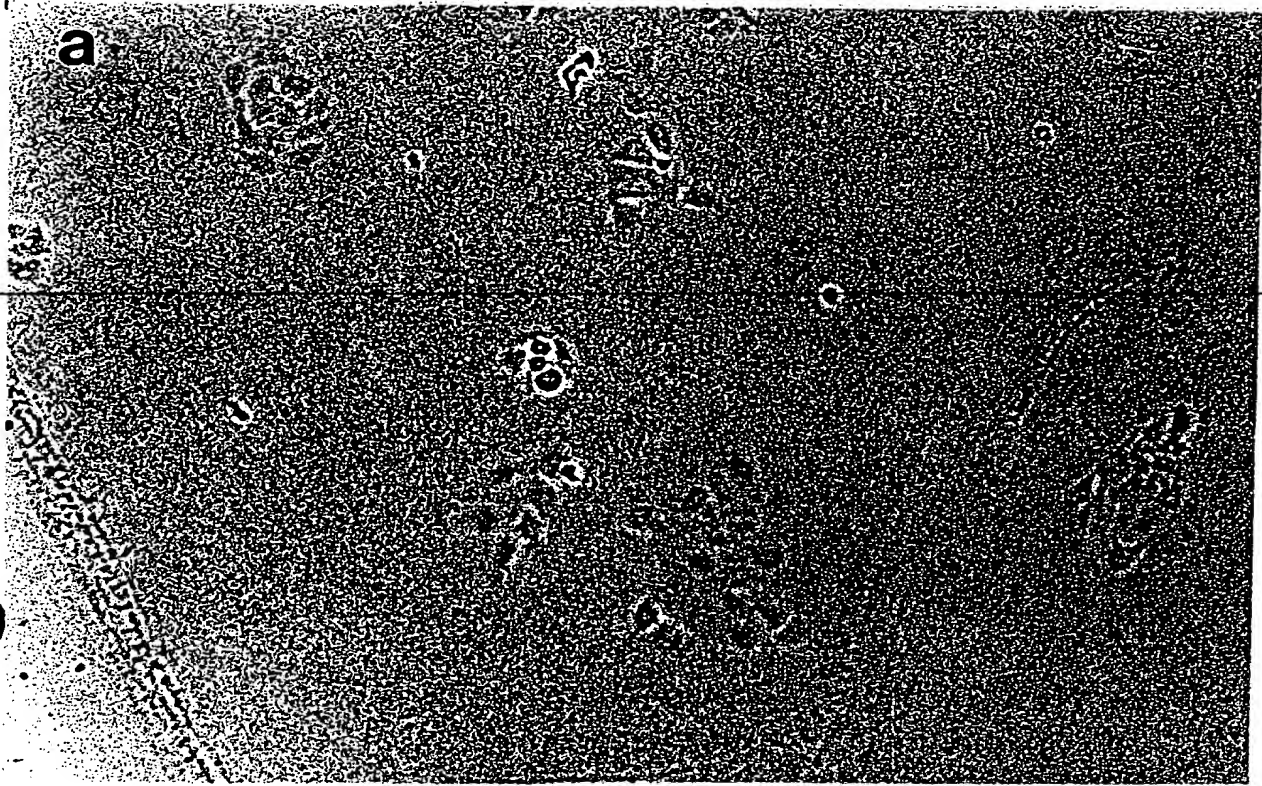


Fig. 12

19 09 93

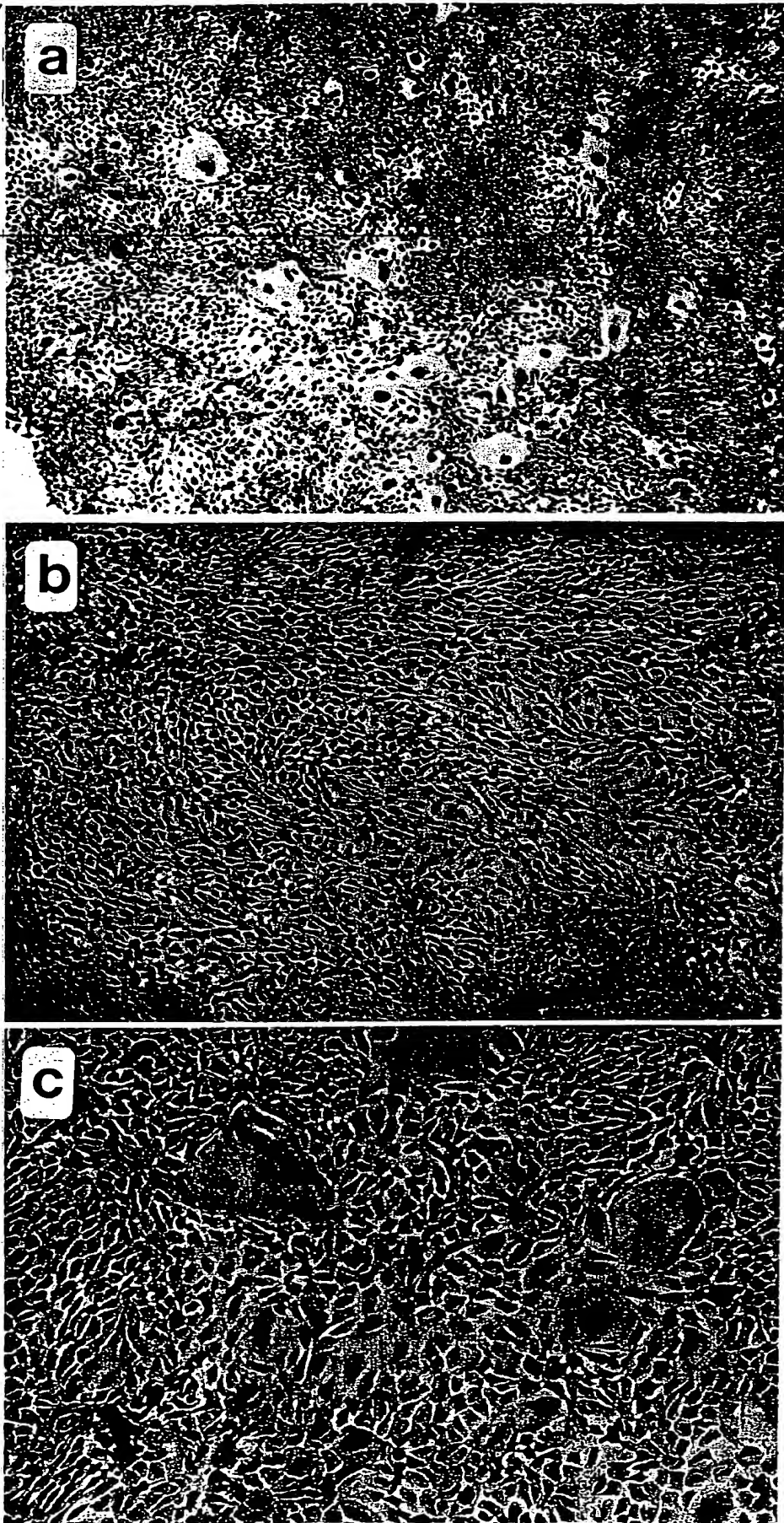


Fig. 13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)